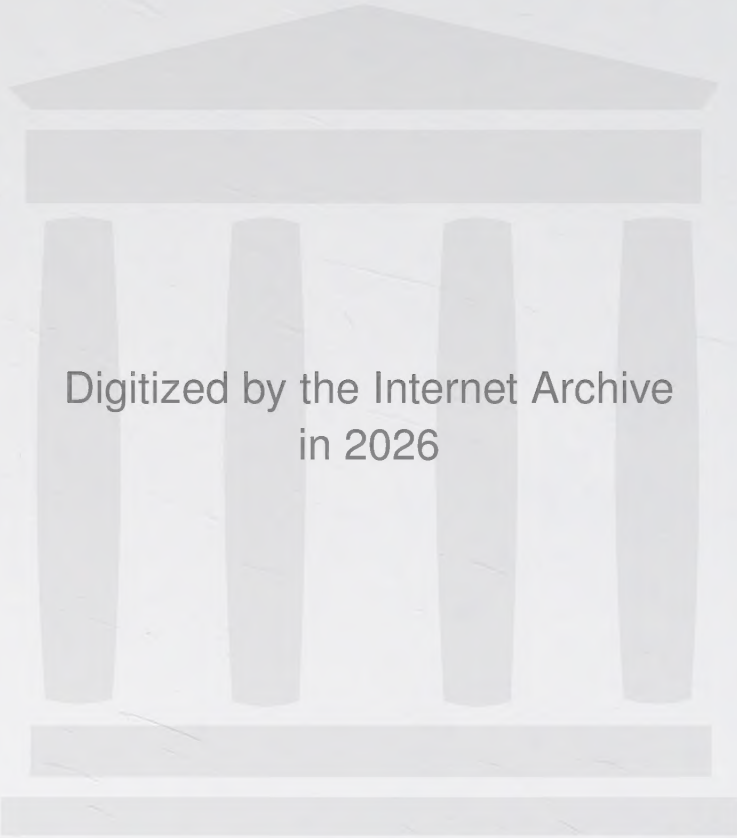


**AUTORADIOGRAPHISCH-BIOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN ZUR BEZIEHUNG ZWISCHEN
MARKIERUNGSINDEX, SILBERKORNDICHTE
UND SPEZIFISCHER AKTIVITÄT DER DNA
IN DER REGENERIERENDEN RATTENLEBER
NACH APPLIKATION VON ^3H -THYMIDIN**

Erwin Stolpe

1977



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555616_0063

AUS DEM PATHOLOGISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. M. Eder

AUTORADIOGRAPHISCH-BIOCHEMISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR
BEZIEHUNG ZWISCHEN MARKIERUNGSINDEX, SILBERKORNDICHTE
UND SPEZIFISCHER AKTIVITÄT DER DNA IN DER REGENERIERENDEN
RATTENLEBER NACH APPLIKATION VON ^3H -THYMIDIN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München



vorgelegt von

Erwin Stolpe

aus

München

1977

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München.

Berichterstatter: Professor Dr. Hartmut Rabes

Mitberichterstatter: Professor Dr. Max Eder

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.7.1977



Herrn Professor Dr. med. H. Rabes, meinem Doktorvater, danke ich für die Themenstellung und die Einführung in die wissenschaftliche Arbeitsweise.

Herrn Dr. med. H.-V. Tuczek sowie den medizinisch-technischen Assistentinnen Fräulein R. Kerler und Fräulein E. Schülgen danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Die quantitative Autoradiographie	5
1.2. Die Wirkung von Phenobarbital auf die Leberzelle	11
1.3. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA	14
1.4. Theoretische Beziehungen zwischen der spezifischen Aktivität der DNA und der quantitativen Autoradiographie nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung	17
2. Material und Methode	20
2.1. Tiermaterial, Schema der PB-Applikation und ^3H -Thymidinmarkierung	20
2.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA	21
2.3. Anfertigung der histologischen Präparate und quantitative Auswertung der Autoradiogramme	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Das Verhalten der ^3H -TdR-Markierungsindices	23
3.2. Veränderungen der Silberkorndichte	25
3.3. Der Anstieg der spezifischen Aktivität der DNA	27
3.4. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse	29
3.5. Die prozentuale Änderung der Kernfläche während der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit	30
4. Diskussion	31
5. Zusammenfassung	39
Literaturverzeichnis	41

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

β -SA	β -Selbstabsorption
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FE	Flächeneinheit
GF	Wachstumsfraktion
$^3\text{H-TdR}$	$^3\text{H-Thymidin}$
LI	Markierungsindex
PB	Phenobarbital
SKD	Silberkorndichte
SKZ	Silberkornzahl
Spez.Akt.	Spezifische Aktivität
T_S	DNA-Synthesedauer

1. EINLEITUNG

Die Autoradiographie ist in den letzten zwanzig Jahren zu einer häufig angewandten Untersuchungsmethode in der biologischen Forschung geworden und hat entscheidend zum Verständnis der Zellproliferation beigetragen.

Das Prinzip der autoradiographischen Untersuchungstechnik besteht darin, daß ionisierende Strahlen, wie sie bei radioaktiven Zerfallsprozessen freigesetzt werden, im Silberbromidkristall einer Fotoemulsion ein Elektron der äußeren Schale des Bromidions aktivieren und somit das Bromidion in ein Bromatom überführen. Das freigewordene Elektron wandert nun im Kristallgitter zum positiv geladenen Silberkation und bildet metallisches Silber, sogenanntes photolytisches Silber (vgl. SCHULTZE, 1968).

In Abhängigkeit von der einfallenden Strahlenmenge bildet sich in der Fotoemulsion ein latentes Bild. Dieses Latenzbild wird durch Entwickeln und Fixieren sichtbar gemacht, wobei die Anzahl der sichtbaren Silberkörner in Relation zur einfallenden Strahlenmenge steht. Die Silberkörner dienen als indirekter Nachweis der Lokalisation der Strahlenquelle.

Bereits 1867 beobachtete Niepce de St. Victor, daß bestimmte Uransalze, wie Urannitrat und Urantartarat, die Silberchlorid- und Silberjodidverbindungen einer Fotoemulsion zu schwärzen vermögen.

Henry Becquerel entdeckte (1898), daß eine Schwärzung photographischer Platten durch Uransulfat auch ohne vorherige Lichteinwirkung möglich ist. Becquerel selbst konnte dieses Phänomen jedoch noch nicht erklären.

Marie und Pierre Curie fanden mit der Entdeckung der natürlichen Radioaktivität die Erklärung dieser Beobachtung. Sie fanden mit dem Radium eine Substanz, die offenbar durch "unsichtbare, energiereiche Strahlung" aus dem Silberbromid einer photographischen Platte metallisches Silber auszuscheiden vermochte.

Lacassagne erhielt (1924) die ersten "Autoradiogramme" von tieri-

schem Gewebe, das natürlich vorkommendes Polonium enthielt.

Die weitere Entwicklung der Autoradiographie als weitverbreitete wissenschaftliche Untersuchungsmethode war jedoch eng verbunden mit der Einführung radioaktiver Isotope in biologisch geeignete Vorläufer, sogenannte Prekursoren. Insbesondere mit der Anwendung autoradiographischer Methoden im Bereich der Elektronenmikroskopie ergab sich das Problem des autoradiographischen Auflösungsvermögens: hierunter versteht man das Trennvermögen zweier dicht benachbarter radioaktiver Strahlungsquellen im histologischen Schnitt.

Diese Trennschärfe ist einerseits von der Korngröße der photographischen Emulsion abhängig, zum anderen ist sie eine Funktion der Schnittdicke des untersuchten Materials; dies wird verständlich, wenn die Strahlungsquelle als punktförmig angesehen wird, von der die ionisierende Strahlung kugelförmig abstrahlt (vgl. SCHULTZE, 1968). Aus diesen Überlegungen folgt weiter, daß energiereiche Strahlung mit kurzen Halbwertszeiten wie z.B. ^{131}J , ^{32}P , ^{14}C , ^{35}S das autoradiographische Auflösungsvermögen reduzieren, da auch schräg auftreffende Strahlung von weiter entfernten Strahlungsquellen zur Silberkornschwärzung im histologischen Präparat führt. Aus diesem Grunde haben sich die energiearmen β -Strahlerquellen, wie beispielsweise das Tritium, als besonders geeignet für die Autoradiographie erwiesen; sie werden als ^3H -Aminosäuren und ^3H -Nukleoside, als Vorläufer der Proteine und Nukleinsäuren häufig angewandt. Diese Untersuchungsmethode gestattet es, bei erhaltener Organstruktur, Aussagen über die Orte der intrazellulären Protein- und Nukleinsäuresynthese zu machen. In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Veröffentlichungen, die mit Hilfe von ^3H -Thymin als spezifischem Vorläufer der DNA-Synthese, weitgehende Einblicke in die Zellproliferation gestatteten. So ermöglichte das von Quastler und Sherman (1959) entwickelte Verfahren der Prozent-markierten-Mitosekurve, die Dauer der einzelnen Zellzyklusphasen, wie die postmitotische G_1 -Phase, die DNA-Synthesephase (S), die prämitotische G_2 -Phase sowie die Mitosephase zu bestimmen. Zusammen mit dem von Mendelsohn (1960) eingeführten Begriff der Growth Fraction (GF), die ein Maß für den Anteil der proliferierenden Zellen an der untersuchten Gesamtpopulation dar-

stellt, ließ sich die Zellkinetik proliferierender Zellsysteme beschreiben und mathematisch erfassen.

Bei all diesen Methoden zur Untersuchung der DNA-Synthese, die im lichtoptischen Bereich durchführbar sind, wird die Frage gestellt, ob eine Struktur der Zelle - in den angeführten Beispielen Zellkern oder Chromosomenfäden in der Mitose - markiert ist oder nicht, das heißt, ob über ihr geschwärzte Silberkörner angetroffen werden oder nicht. Wird jedoch die Frage nach der Anzahl der Silberkörner gestellt und versucht, aus dieser Angabe Rückschlüsse auf die Menge der je Zeiteinheit inkorporierten, radioaktiven Vorläufer zu ziehen, um aus dem Autoradiogramm auf die Syntheseaktivität z.B. der DNA zu schließen, so ergeben sich hierbei aus theoretischen und praktischen Erwägungen heraus oftmals große Schwierigkeiten, die nur unter ganz bestimmten - oftmals nicht kontrollierbaren - Versuchsbedingungen aussagefähige Rückschlüsse erlauben. Die Anfertigung von Autoradiogrammen einerseits und die biochemische Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA nach Applikation von ^3H -Thymidin andererseits ermöglicht jedoch, die Silberkornentstehung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu untersuchen und ihren Einfluß auf die Auswertung von Autoradiogrammen zu überprüfen.

In der folgenden Arbeit haben wir daher am Modell der regenerierenden Rattenleber simultane autoradiographische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurden für die Herstellung der Autoradiogramme bewußt nur einfach durchführbare Versuchsbedingungen gewählt. Da bekannt ist, daß bei der quantitativen Silberkornzählung Veränderungen der Vorläuferpoolgröße oder der Geometrie der untersuchten Strukturen die Silberkornentstehung entscheidend beeinflussen, haben wir einen Teil der Untersuchungen an der Phenobarbital-stimulierten Rattenleber durchgeführt, um zu sehen, wie weit, unter pharmakologisch veränderten Bedingungen, das autoradiographisch gewonnene Ergebnis von der biochemischen Untersuchung abweicht. Im Rahmen dieses Arbeitsprogrammes wurde in der hier vorgelegten Arbeit die quantitative Auswertung der Autoradiogramme durchgeführt.

In den folgenden Kapiteln sollen die beiden unterschiedlichen

Untersuchungsmethoden, die quantitative Autoradiographie und die biochemische Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA nach Applikation von ^3H -Thymidin, ihre jeweiligen Vorzüge sowie ihre begrenzenden Faktoren beschrieben werden. Im Anschluß an den ersten Abschnitt werden die Wirkung von Phenobarbital auf strukturelle und biochemische Veränderungen der Leberzelle und der zu erwartende Effekt auf die Silberkornentstehung diskutiert. Im dritten Abschnitt sollen die theoretisch zu erwartenden Beziehungen zwischen autoradiographisch und biochemisch gewonnenen Ergebnissen hergestellt, und Faktoren, die beide Untersuchungsmethoden beeinflussen, diskutiert werden.

1.1. Die quantitative Autoradiographie

Während in den Anfängen der autoradiographischen Technik qualitative Untersuchungsmethoden im Vordergrund standen, bei denen - wie bereits erwähnt - die Entscheidung zu treffen war, ob eine Struktur gegenüber der Umgebung "markiert", das heißt mit Silberkörnern belegt war oder nicht, versuchte man mit zunehmendem Wissensstand, die Autoradiogramme quantitativ auszuwerten. Bei dieser Fragestellung geht es zum Beispiel darum, aus der Änderung der Silberkornzahl je Zeiteinheit über vergleichbaren Zellstrukturen, auf die Inkorporationsrate der radioaktiven Prekursoren zu schließen. Unter der Voraussetzung, daß eine konstante Menge radioaktiver Impulse zur Schwärzung eines Silberkorns führt und daß ein Mehrfaches dieser Menge auch proportional mehr Silberkörner induziert, kann aus der Anzahl der Silberkörner, ähnlich wie bei der Messung radioaktiver Zerfallsprozesse im Geiger-Müller-Zählrohr oder, bei energiearmen Strahlungsquellen, im Scintillationsmeßgerät, auf die in bestimmten Zellstrukturen inkorporierte Radioaktivität geschlossen werden.

Da sich diese Untersuchung auf ^3H -Thymin als Prekursor der DNA-Synthese beschränkt, sollen im folgenden insbesondere die Probleme der quantitativen ^3H -Thymin-Autoradiographie besprochen werden.

Aus den bereits erwähnten Gründen eignet sich insbesondere das Isotop Tritium wegen seiner energiearmen β -Strahlung und dem hieraus resultierenden guten Auflösungsvermögen als Prekursor für autoradiographische Untersuchungen.

Auf der anderen Seite wird jedoch ein großer Teil der energiearmen Strahlung im zu untersuchenden histologischen Präparat selbst absorbiert und gelangt überhaupt nicht in die aufgebrachte strahlenempfindliche Emulsionsschicht. Diese Erscheinung wird als β -Selbstabsorption bezeichnet und wurde von Maurer und Primbsch (1964) eingehend untersucht. Diese Autoren bestimmten die Größe der β -Selbstabsorption an 0,3-0,6 μm dicken Leberschnitten, die in Methacrylat eingebettet und mit ^3H -Aminosäuren markiert waren. Wird nun auf diese Weise die Anzahl der Silberkörner in Abhängigkeit von der Schnittdicke bestimmt, so zeigt sich, daß die Silber-

kornzahl nur in einem sehr engen Bereich linear mit der Schnittdicke ansteigt; die Kurven haben Sättigungscharakter, wobei die Sättigungsgrenze je nach untersuchter Struktur, wie z.B. Karyoplasma, Nucleolus oder Cytoplasma, unterschiedlich schnell erreicht wird. Das bedeutet aber, daß z.B. bei einem Leberschnitt von 1 μm Dicke wegen der β -SA über dem Nucleolus nur 20 %, über dem Cytoplasma 60 % und über dem Karyoplasma 80 % der Silberkörner entstehen, während ohne Berücksichtigung dieses Effektes mit einer Ausbeute von 100 % zu rechnen wäre. Bei dünnen Schnitten ist also, je nach untersuchter Zellstruktur, die unterschiedlich große Selbstabsorption zu korrigieren; hierzu muß jedoch die jeweilige Dichte der verschiedenen Strukturen bekannt sein, die nur durch aufwendige Verfahren, wie beispielsweise interferometrisch oder durch die Absorption sehr weicher Röntgenstrahlen bestimmt werden kann.

Dieselben Autoren bestimmten auch für verschiedene Zellstrukturen die Schnittdicke, bei der die Sättigungsgrenze erreicht wird; sie beträgt etwa 0,5 μm für das Cyto- und Karyoplasma und 0,1 μm für das Nukleoplasma. Bei größeren Schnittdicken bleibt die Silberkornzahl konstant und wird durch die Schnittdicke selbst nicht mehr beeinflusst. Werden nun - wie in unserer Versuchsanordnung - 3-4 μm dicke Paraffin-eingebettete Schnitte hergestellt, so folgt aus dem vorher Gesagten, daß die Silberkörner über den Leberzellkernen nur von denjenigen ^3H -Thymidinmolekülen herkommen, die in einem Bereich von 0,5 μm unter der Photoemulsion liegen, in tieferen Schichten inkorporiertes radioaktives Material trägt wegen der β -Selbstabsorption nicht zur Schwärzung der Silberkörner bei. Aus diesem Grunde eignen sich flüssige Emulsionen, bei denen sich keine gleichmäßige Verteilung der lichtempfindlichen Schicht über den zu untersuchenden Strukturen erzielen läßt, nicht für die quantitative Autoradiographie; bei ihr dürfen nur sog. Stripping-Filme, bei denen die Silberbromidkristalle in einer Trägerschicht, die sich sehr dicht an das zu untersuchende Objekt anlagert, gleichmäßig verteilt sind, Verwendung finden (vgl. SCHULTZE, 1968; AMLACHER, 1974).

Aus den bisherigen Ausführungen wird verständlich, daß die Dichte der untersuchten Strukturen einen entscheidenden Einfluß auf die

Anzahl der Silberkörner im Autoradiogramm hat und daß bereits geringe Schwankungen des Abstands zwischen ^3H -Thymidin und aufgetragenen Silberbromidkristallen zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen können.

Aus diesen Gründen ist die Bestimmung der Silberkornzahl (SKZ) mit großen Fehlern behaftet. Genauere Ergebnisse erhält man, wenn die Silberkornzahl je Flächeneinheit, also die Silberkorndichte (SKD), angegeben wird. Daher haben wir in der hier vorgelegten Arbeit die Fläche gut angeschnittener, das heißt möglichst genau in der Schnittebene liegender Leberzellkerne bestimmt. Auch hierbei zeigt es sich, daß bei zu hoher Silberkorndichte die Kernflächen nicht immer exakt bestimmt werden können, weil ein großer Teil der Silberkörner randständig im Kern kumuliert und die Festlegung der Kerngrenzen erschwert.

Im folgenden sollen noch einige weitere Schwierigkeiten, die bei der quantitativen Auswertung von Autoradiogrammen auftreten können, diskutiert werden.

Ähnlich wie die in der Photographieverwendeten Filme, bestehen auch die in der Autoradiographie benützten "Stripping-Filme" aus Gelatine als Trägermaterial, in die Silberbromidkristalle eingelagert sind. Durch die auftreffende radioaktive Strahlung werden Ionen frei, die das Kristallgitter an bestimmten Stellen negativ aufladen. Diese Orte werden durch Silberionen neutralisiert, so daß metallisches Silber entsteht (vgl. SCHULTZE, 1968).

Dieses sogenannte photolytische Silber bildet ein unsichtbares, latentes Bild, das durch den Entwicklungsvorgang sichtbar gemacht wird. Das metallische Silber bildet zunächst einen kurzen Faden, der während der weiteren Entwicklung zu einem fädigen Knäuel auswächst und lichtmikroskopisch als Silberkorn in Erscheinung tritt (vgl. SCHULTZE, 1968). Liegen die "Treffer" der radioaktiven Strahlung dicht beieinander, und ist eine hohe Silberkorndichte über den Zellkernen vorhanden, so sind die einzelnen Silberkörner oft schwer voneinander zu trennen; sie überlappen sich und bilden stellenweise Konglomerate unterschiedlicher Größe. In diesem Fall wird man die Beurteilung der Silberkornzahl von der

Standardgröße der kleinsten Silberkörner abhängig machen. Die visuelle Zählmethode ist hierdurch großen Schwankungen unterworfen; es scheint daher sinnvoll, die Auswertung einer Versuchsreihe von nur einer Person vornehmen zu lassen und ausreichend große Meßreihen durchzuführen, die einen repräsentativen Querschnitt ergeben.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Silberkornbestimmung entsteht durch den sogenannten Background oder Nullwert der Autoradiogramme. Hierunter versteht man die Menge vorhandener Silberkörner, die beispielsweise aufgrund der Höhenstrahlung, besonders bei längerer Expositionszeit entsteht. Erfahrungsgemäß haben empfindlichere Filme auch einen höheren Background. Auch wenn das nicht inkorporierte, niedermolekulare ^3H -Thymidin nicht sorgfältig genug ausgewaschen wird, entstehen zusätzliche Silberkörner, die das Versuchsergebnis verfälschen.

Um die aufwendige visuelle Zählmethode zu vereinfachen, wurde versucht, halbautomatische Verfahren einzuführen; so haben Dudley und Pelc (1953), Tolles (1959), Mazia und Mitarbeiter (1955) Geräte entwickelt, die teilweise mit elektronischen Hilfsmitteln die Silberkornzahl in einer bestimmten mikroskopischen Fläche indirekt bestimmen. Dörmer und Mitarbeiter (1966) und Dörmer (1967) haben ein Verfahren angegeben, bei dem die Reflexion eines Lichtstrahls durch die Silberkörner auflichtphotometrisch gemessen wird. Alle diese Methoden sind jedoch ungenauer als das visuelle Zählverfahren.

Eine Übereinstimmung zwischen der spezifischen Aktivität der DNA und der quantitativen Autoradiographie kann nur erwartet werden, wenn zwischen radioaktiven Zerfallsprozessen und Silberkorndichte eine lineare Beziehung besteht. Wie in diesem Abschnitt bereits erwähnt wurde, entsteht im Autoradiogramm zunächst ein latentes Bild. Das Auslöschen latenter Bilder wird als Fading-Effekt bezeichnet; er kann insbesondere bei ungünstigen Expositionsbedingungen auftreten und scheint in geringem Ausmaße von der benützten Emulsion abzuhängen (MC LAUGHLIN und EHRLICH, 1954). Fading-Phänomene treten dann auf, wenn Sauerstoff in die Silberbromidkristallschicht der verwendeten autoradiographischen Emulsionen

oder Filme eindringt und dort zur Oxydation latenter Bilder führt (ALBOUY und FARAGGI, 1949). Feuchtigkeit scheint das Eindringen von Sauerstoff zu begünstigen und kann zur Reduktion latenter Bilder führen (NORRIS und WOODRUFF, 1954; MESSIER und LEBLOND, 1957; HERZ, 1959). Aus diesem Grunde werden die Autoradiogramme unter Zugabe eines Trockenmittels bei 4°C exponiert (KOPRIWA und LEBLOND, 1962). Werden diese Fehlermöglichkeiten berücksichtigt, so kann erwartet werden, daß zwischen der Zahl der Zerfallsprozesse und der Anzahl der entstandenen Silberkörner eine hinlänglich genaue lineare Beziehung besteht.

Die Frage, wieviele Zerfallsprozesse zur Bildung eines Silberkorns notwendig sind, läßt sich nicht allgemein beantworten. Die Anzahl der durch eine bestimmte Menge an Zerfallsprozessen gebildeten Silberkörner hängt unter anderem von der Empfindlichkeit des benutzten Filmmaterials, der Expositionsdauer sowie den geometrischen Bedingungen der jeweiligen Versuchsanordnung ab. In der Literatur wird bei unterschiedlichen experimentellen Anordnungen angegeben, daß nach Tritiummarkierung 1,3 bis etwa 200 radioaktive Zerfälle notwendig sind, um ein Silberkorn zu erzeugen (LAJTHA und OLIVER, 1959; WIMBER et al., 1960; KISIELESKI et al., 1961; MAURER und PRIMBSCH, 1964; CARO und SCHNÖS, 1965; BACHMANN und SALPETER, 1965, 1967).

Die kritische Abwägung der oftmals nicht leicht überschaubaren Fehlerquellen bei der autoradiographischen Technik, insbesondere bei der quantitativen Autoradiographie, sollte zeigen, daß sie nur unter möglichst standardisierten Bedingungen durchgeführt werden darf, und daß zu jedem Experiment ein Kontrollversuch gefordert werden muß. Bereits bei dieser Forderung tritt jedoch ein Problem auf, das in vielen Fällen nicht leicht zu lösen ist. Wird nämlich, wie es die Fragestellung der meisten experimentellen Anordnungen ergibt, eine Versuchsgruppe anders behandelt als die Kontrollreihe, so läßt sich meist nicht entscheiden, ob differierende Ergebnisse auf eine unterschiedliche Vorbehandlung, z.B. mit Pharmaka, oder auf durch sie hervorgerufene Änderungen der Geometrie des histologischen Präparates, wie z.B. Kernschwellungen, zurückzuführen sind.

Die Fragestellung dieser Arbeit war jedoch, die Beziehungen zwischen Markierungsindex und Silberkorndichte im Autoradiogramm sowie der biochemisch bestimmten spezifischen Aktivität der DNA nach ^3H -Thymidin-Markierung unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu überprüfen. Aus diesem Grund wurde ein Teil der Versuchstiere mit Phenobarbital vorbehandelt. Bevor die Methode der Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA geschildert und diskutiert wird, soll daher im folgenden Abschnitt die Wirkung dieses Pharmakons auf die Leberzelle beschrieben werden.

1.2. Die Wirkung von Phenobarbital auf die Leberzelle

Bereits 1958 beobachtete Remmer, daß die Dauer einer Evipannarkose bei Ratte und Maus durch die Vorbehandlung mit Phenobarbital verkürzt wurde und schloß daraus, daß dieses Pharmakon möglicherweise über den Mechanismus einer Enzyminduktion den raschen Abbau anderer Medikamente bewirkt. In den folgenden Jahren zeigte sich, daß nach Applikation von Phenobarbital (5-äthyl-5-phenyl-barbitursäure, PB) neben anderen Proteinen insbesondere das Cytochrom P₄₅₀ in der Ratten- und Mäuseleber zunimmt (REMMER und MERKER, 1963a, b; ORRENIUS et al., 1965; STÄUBLI et al., 1969; BARON und TEPHLY, 1970; GREIM et al., 1970; STENGER und JOHNSON, 1972; BUDILLON, 1972; KEIDING et al., 1973; LU et al., 1973).

Dieses Enzym ist ein Bestandteil der mischfunktionellen Oxydase, die den Abbau zahlreicher Pharmaka beschleunigt. Das morphologisch faßbare Korrelat dieser biochemischen Veränderung ist die Vermehrung insbesondere der Membranen des glatten endoplasmatischen Reticulums (REMMER und MERKER, 1963; HERDSON et al., 1964; ORRENIUS et al., 1965; FOUTS and ROGERS, 1965; JONES and ARMSTRONG, 1965; JONES and FAWZETT, 1966; ORRENIUS und ERICSSON, 1966; STÄUBLI et al., 1969; STENGER et al., 1970; CHEDID und NAIR, 1972; BOLENDER und WEIBEL, 1973).

Mit diesen Veränderungen geht eine Zunahme des Lebergewichts um 20 bis 30 % einher (KATO et al., 1966; SHUSTER und JICK, 1966; KURIYAMA et al., 1969; KLASSEN, 1969; PAULINI und BENEKE, 1970; CZOK und DANMAN, 1972; HARDONK und KOUDSTAAL, 1972; TÓTH, 1972; KEIDING et al., 1973).

Die Arbeitsgruppen von Stäubli und Mitarbeitern (1969) sowie von Bolender et al. (1973) haben in einer eingehenden morphometrisch-elektronenmikroskopischen Analyse die Phenobarbital-induzierten Veränderungen und ihre Rückbildung in der Rattenleber quantitativ untersucht: danach nahm das Durchschnittsvolumen einer Leberzelle nach mehrfacher Phenobarbitalapplikation um rund 26 % zu. Zu dieser Volumenzunahme lieferte das glatte endoplasmatische Reticulum einen Anteil von mehr als 50 %, während das Kernvolumen selbst nur gering anstieg. Andere Zellorganellen, wie Mito-

chondrien, Peroxysomen und dense bodies, vergrößerten sich insgesamt nicht; die Anzahl der Mitochondrien und Mikrobodies stieg zwar an, ihr Durchschnittsvolumen sank jedoch ab.

Eine andere Frage, die hier noch kurz diskutiert werden soll, ist die, ob Phenobarbital selbst unter bestimmten Bedingungen die Proliferation beeinflussen kann. Paulini und Mitarbeiter (1971) zeigten, daß nach unterschiedlich hohen Phenobarbitaldosen mit zunehmendem Alter der Versuchstiere die Anzahl der diploiden Leberzellkerne abnahm, während die Menge der tetraploiden und oktoploiden Kerne anstieg.

In der intakten Leber adulter Ratten konnte nur eine sehr geringfügige PB-induzierte Zunahme des Markierungs- und Mitoseindex nachgewiesen werden (PAULINI et al., 1970, 1971a, b, 1972a, b; TUCZEK et al., 1975). Im Gegensatz hierzu wurde in der Leber vorwiegend junger Ratten mehrfach eine verstärkte Zellproliferation nach Phenobarbital beschrieben (SCHLICHT et al., 1967, 1968; SCHULTE-HERMANN et al., 1968, 1972; PAULINI et al., 1970, 1971a, b, 1972).

Eine andere Situation ergibt sich, wenn der regenerierenden Rattenleber nach Zweidrittelhepatektomie zusätzlich PB verabreicht wird. Unter diesen Bedingungen wurde von einigen Autoren eine Stimulation der Zellproliferation beschrieben (JAPUNDŽIĆ et al., 1967; RÜTTIMANN, 1972); während eine einmalige, unmittelbar postoperativ gegebene Dosis von 100 mg PB/kg Körpergewicht den Anstieg der ^{131}JdU -Inkorporation und des Mitoseindex verzögerte (BÜRKI et al., 1971; SCHINDLER und BÜRKI, 1971). Demgegenüber konnten Tuczek et al. (1975) zeigen, daß mehrfache Gaben von 90 mg PB/kg Körpergewicht vor und nach Zweidrittelhepatektomie der Rattenleber zu einer verstärkten Synchronisation DNA-synthetisierender Zellen zu Beginn der Proliferation führten.

Aus den in diesem Kapitel angeführten Beobachtungen erscheint es theoretisch denkbar, daß eine zusätzliche Phenobarbitalapplikation z.B. über den Mechanismus der Zellvergrößerung für die quantitative Auswertung von Autoradiogrammen nach ^3H -TdR-Markierung neue geometrische Verhältnisse induziert, die ohne entsprechende Kon-

trollmöglichkeiten zu falschen Ergebnissen führen.

Da jedoch in der vorliegenden Arbeit biochemische und autoradiographische Verfahren simultan angewandt wurden, ergibt sich die Möglichkeit, den Aussagewert der quantitativen Autoradiographie zu überprüfen.

1.3. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA

Unter der spezifischen Aktivität der DNA wird die Anzahl der im Scintillationszähler bestimmten Impulse je Zeiteinheit bezogen auf ein Milligramm DNA nach Applikation eines radioaktiven Vorläufers verstanden und als cpm/mg (Counts per milligramme and minute) angegeben. Das Prinzip dieser Untersuchungsmethode besteht darin, daß die DNA als DNA-Proteinkomplex aus dem Gewebe extrahiert wird; der eine Anteil des gewonnenen Materials dient zur Messung der Radioaktivität im Scintillationszähler, der andere zur photometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes mit Hilfe einer Eichkurve, zu deren Aufstellung auf eine Lösung bekannten DNA-Gehaltes (z.B. Kalbsthymus-DNA) zurückgegriffen wird. Bei dieser Methode wird ein repräsentativer Anteil der gesamten DNA nach Zerstörung des Organs erfaßt. Für die Untersuchung an der Leber folgt daraus, daß nicht bekannt ist, welche Zellarten und welcher Anteil der verschiedenen Zellpopulationen in der Leber an der DNA-Synthese teilnehmen.

Da sich die hier vorgelegte Arbeit im wesentlichen auf die quantitative Auswertung der Autoradiogramme beschränkt, soll im folgenden nur kurz auf die einzelnen biochemischen Untersuchungsschritte und ihre Fehlermöglichkeiten eingegangen werden.

Ähnlich wie bei der Anfertigung von Autoradiogrammen, bei der das niedermolekulare, nicht in die DNA eingebaute, radioaktiv markierte Thymidin durch sorgfältiges Auswaschen entfernt werden muß, um den unspezifischen Background zu reduzieren, so ist auch bei der biochemischen Extraktion ein exaktes Auswaschen des überschüssigen, nicht inkorporierten ^3H -Thymidins notwendig. Nach Homogenisation des Lebergewebes in Aqua dest. mit Hilfe eines Potter-Homogenisators werden die niedermolekularen Substanzen durch mehrmaliges Füllen und Abzentrifugieren der hochmolekularen Anteile mit Trichloressigsäure ausgewaschen. Unter bestimmten Versuchsbedingungen besteht jedoch die Gefahr, daß gerade die neusynthetisierte DNA, die in vivo durch das Enzym Ligase zur hochmolekularen Desoxyribonukleinsäure zusammengesetzt wird, in die niedermolekulare Fraktion gelangt und so die gemessene spezifische Aktivität reduziert.

Bei der Autoradiographie wurde im vorangegangenen Abschnitt diskutiert, daß die β -Selbstabsorption unter bestimmten Bedingungen zur Reduktion der Silberkornzahl führen kann. Vergleichbare Effekte können bei der biochemischen Extraktion im Scintillationszähler durch Trübung der Meßprobe auftreten. Dieser Effekt wird als Quench bezeichnet. Bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA wird eine Lipidentfernung durch mehrmalige Alkohol-Äther-Extraktion durchgeführt, um Fehler bei der Scintillationsmessung bzw. Photometrie zu vermeiden. Auch bei dieser Prozedur können DNA-Untereinheiten in die Waschlösung übertreten und die Messung der spezifischen Aktivität verfälschen. Nach Auswaschen der niedermolekularen Substanzen sowie der Entfernung der Lipide wird der zurückbleibende DNA-Proteinkomplex in NaOH hydrolysiert; ein Teil des Hydrolysats wird mit Scintillationsflüssigkeit versetzt, die die schwache β -Strahlung in Lichtblitze umwandelt, die mit Hilfe einer Photozelle im Scintillationsmesser registriert werden können. Der andere Teil des Hydrolysats dient zur photometrischen Bestimmung des DNA-Gehaltes. Bei der hier durchgeführten Versuchsanordnung wurde die von Burton (1956) angegebene Modifikation der von Dische (1930) beschriebenen Farbreaktion mit Diphenylamin angewandt. Dabei wird der DNA-Gehalt durch den Vergleich der gemessenen Extinctionswerte mit einer Eichkurve, die durch Verdünnung von Kalbsthymus-DNA hergestellt wurde, berechnet. Obwohl der Mechanismus der Farbreaktion noch nicht bis in alle Einzelheiten bekannt ist, weiß man, daß das Diphenylamin mit dem Pentoserest der Purinnukleotide reagiert. Hieraus wird verständlich, daß der DNA-Proteinkomplex vollständig hydrolysiert sein muß, wenn der DNA-Gehalt genau bestimmt werden soll. Eine weitere Fehlerquelle ist die Interferenz der Farbreaktion mit verschiedenen Substanzen. So ist aus den Untersuchungen von Burton (1956) bekannt, daß Pyruvat, Tannin, Fructose und Arabinose die Farbentwicklung beeinflussen und so die Bestimmung des DNA-Gehaltes verfälschen können. Neuere Untersuchungen ergaben, daß z.B. Sialinsäure, ein Membranbestandteil, mit dem Diphenylaminreagens reagiert (CROFT und LUBRAN, 1965).

In unseren Experimenten wurde daher gezeigt, daß Phenobarbital in den angewandten Konzentrationen die photometrische Bestimmung

des DNA-Gehaltes nicht beeinflusst. Wie erwähnt, müssen auch bei der Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA die aufgezeigten Fehlermöglichkeiten sorgfältig ausgeschlossen werden. Der Vorteil dieser Methode ist die Kenntnis der pro Milligramm DNA und je Zeiteinheit inkorporierten Radioaktivität des markierten Thymidins. Diese Daten sind ein Maß für die DNA-Syntheseaktivität der untersuchten Probe und geben die Möglichkeit, bei simultaner Anfertigung von Autoradiogrammen die spezifische Aktivität der DNA auf die einzelne DNA-synthetisierende Zelle zu beziehen, und so die Anzahl der im Autoradiogramm entstehenden Silberkörner unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zu überprüfen.

Im folgenden Kapitel sollen nun relativ einfache Beziehungen zwischen der spezifischen Aktivität der DNA und den autoradiographisch gewonnenen Daten aufgestellt werden.

1.4. Theoretische Beziehungen zwischen der spezifischen Aktivität der DNA und der quantitativen Autoradiographie nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln über die "quantitative Autoradiographie" und die "Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA" gezeigt wurde, läßt sich die Inkorporation von ^3H -TdR sowohl aus der Anzahl der Silberkörner über den Zellkernen als auch aus dem mit biochemischen Methoden extrahierten DNA-Proteinkomplex bestimmen. Mit der einen Methode erhält man als Maß für die ^3H -TdR-Inkorporation die Silberkornzahl (SKZ) je Flächeneinheit, also die Silberkorndichte (SKD), während die andere Methode die spezifische Aktivität der DNA als Counts je mg DNA und min (cpm/mg) ergibt, so daß sich bei gleichzeitiger Anwendung beider Verfahren die Zusammenhänge zwischen beiden Parametern überprüfen lassen.

Theoretisch ergeben sich dabei unter Idealbedingungen, d.h. ohne Berücksichtigung möglicher Fehlerquellen, verhältnismäßig einfache Beziehungen: Das Verhalten der spezifischen Aktivität der DNA sollte proportional zu der Silberkorndichte sein. Der Proportionalitätsfaktor gibt dann an, wieviele im Scintillationsmeßgerät bestimmte Counts per mg DNA und min notwendig sind, um unter den jeweiligen Versuchsbedingungen ein Silberkorn zu erzeugen. Diese Überlegung läßt jedoch folgenden wichtigen Gesichtspunkt außer Acht. Da durch den biochemisch extrahierten DNA-Komplex sowohl DNA ruhender als auch DNA proliferierender Zellen erfaßt wird, muß die spezifische Aktivität auf diejenigen Zellen bezogen werden, die sich zum Untersuchungszeitpunkt auch tatsächlich in der S-Phase befanden. Hierzu ist jedoch die Kenntnis des jeweiligen Markierungsindex notwendig; wird nun der Quotient aus spezifischer Aktivität und Markierungsindex (LI) gebildet, so wird die spezifische Aktivität auf diejenigen Zellen, die sich in der DNA-Synthesephase befinden, bezogen und sollte mit der Silberkorndichte übereinstimmen. Umgekehrt ergibt dann das Produkt aus Silberkorndichte und Markierungsindex die spezifische Aktivität der DNA.

Wie eingangs erwähnt wurde, ist jedoch die Bestimmung des Mar-

kierungsindex, die die Entscheidung fordert, ob eine Zelle mit Silberkörnern belegt ist oder nicht, unter bestimmten Bedingungen wiederum von der inkorporierten ^3H -TdR-Menge abhängig und verhält sich dann unter diesen Umständen möglicherweise wiederum proportional zur spezifischen Aktivität.

Aus diesen Überlegungen geht hervor, daß die unter einfachen Versuchsbedingungen durchgeführte quantitative Autoradiographie den theoretisch zu erwartenden Beziehungen nicht ohne weiteres genügt.

Im folgenden soll noch kurz auf den Begriff des Thymidinpools eingegangen werden; dieser Parameter betrifft beide Untersuchungsmethoden in gleicher Weise und kann je nach Versuchsbedingungen zu Fehlinterpretationen führen. Unter dem DNA-Vorläuferpool wird diejenige Menge an Thymidinmonophosphat verstanden, die bereits zu Beginn der DNA-Synthesephase in der Zelle vorhanden ist. Wird nun durch die exogene ^3H -TdR-Markierung der Zelle zusätzliches Tritium-markiertes Thymidin zur Verfügung gestellt, so wird je nach Menge des bereits endogen vorliegenden Thymidins mehr oder weniger viel exogen zugeführtes, markiertes Thymidin eingebaut. Der in die DNA inkorporierte Anteil des exogen zugeführten ^3H -Thymidins, der also von der Größe des endogenen Vorläuferpools abhängt, wird jedoch bei beiden Untersuchungsmethoden gemessen.

Lang und Mitarbeiter (1968) zeigten, daß im Mittel nur etwa 0,1-1 % des applizierten ^3H -TdR in die DNA der S-Phasenzellen eingebaut wird. Hieraus wird verständlich, daß bereits kleine Veränderungen des Vorläuferpools, wie sie z.B. möglicherweise durch Pharmaka bewirkt werden, zu Veränderungen in der Aufnahme des exogen applizierten ^3H -Thymidins und auf diese Weise zu verfälschten Ergebnissen führen.

Ist das ^3H -Thymidin erst einmal in die Zelle gelangt, so erfolgt der Umsatz sehr schnell. Die Equilibrierung zwischen den phosphorylierten Derivaten des markierten Thymidins einerseits und den Degradationsprodukten andererseits erfolgt in wenigen Minuten (CHANG und LOONEY, 1965; BUCHER und OAKMAN, 1969).

Von diesem Vorgang muß jedoch der Begriff der integralen Verfüg-

barkeitszeit streng unterschieden werden: Hierunter versteht man die Zeit von der Injektion bis zum Einbau des phosphorylierten ^3H -Thymidins in die DNA. Diese Zeit beträgt bei den üblicherweise verabreichten ^3H -Thymidin-Dosen etwa 40-60 min, wobei jedoch der größte Anteil in den ersten 20 min inkorporiert wird (HUGHES et al., 1958; RUBINI et al., 1960; KISIELESKI et al., 1961; RUBINI et al., 1962; KOBURG und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964).

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit soll nun die Versuchsdurchführung beschrieben werden; dabei wurde Wert darauf gelegt, für die Anfertigung der Autoradiogramme möglichst einfache, leicht durchführbare Versuchsbedingungen zu wählen.

2. MATERIAL UND METHODE

2.1. Tiermaterial, Schema der PB-Applikation und ^3H -Thymidin-markierung

Männliche, 9 - 11 Wochen alte Wistar AF-Han-Ratten eigener Zucht mit einem Körpergewicht von $212, 6 \pm 7,3$ g (Standardabweichung) erhielten Futter (Altromin^R Standarddiät) und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden in zwei Gruppen unterteilt: 15 Tieren wurde an fünf aufeinanderfolgenden Tagen gegen 23⁰⁰ Uhr jeweils 90 mg PB/kg Körpergewicht (PB: Phenobarbital-Natrium, Merck, Darmstadt) in 0,43 bis 0,47 ml einer 0,15 molaren NaCl-Lösung i.p. injiziert. Die zweite Gruppe, die der Kontrolltiere (n=12), erhielt äquivalente Volumina 0,15 molarer Kochsalzlösung i.p.. 10 Stunden nach der letzten Injektion erfolgte die 2/3-Resektion der Leber nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) in Äthernarkose. Es werden hierbei der mittlere und der linke Leberlappen, und damit der Hauptanteil der Lebermasse entfernt. Die gesamte Lebermasse wird damit auf 1/3 reduziert. Wegen der erheblichen allgemeinen Resistenz der Ratten, sind die Prinzipien der Asepsis nur bedingt erforderlich.

Nach 22-stündiger Regenerationszeit wurden jeweils 3-5 Tiere beider Gruppen durch eine einmalige i.p. ^3H -Thymidin-Injektion von $0,8 \mu\text{Ci/g}$ Körpergewicht (^3H -TdR, Desoxythymidin-6- ^3H , spezifische Aktivität 5Ci/mM, Radiochemical Centre Amersham) in 0,8-0,9 ml einer 0,15 m NaCl-Lösung markiert.

10, 20 und 30 Minuten nach der jeweiligen Injektion wurden die Tiere durch Nackenschlag getötet.

2.2. Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA

Von jedem Tier wurden jeweils gleiche Anteile Lebergewebe entnommen, gepoolt und, nach Entfernung des gröberen Bindegewebes, in einem Potter-Homogenisator mit Teflonstempel im Verhältnis 1/20 (g/ml) in Aqua dest. bei 4°C homogenisiert.

Danach erfolgte die Extraktion des DNA-Proteinkomplexes nach vorausgegangener Lipidextraktion nach der Methode von Munro und Fleck (1966). Es handelt sich hierbei um eine Modifikation der Methode von Schmidt und Thannhauser (1945).

Die Radioaktivität wurde im Scintillationszähler (Packard-Tricarb 3214) gemessen, und schließlich folgte die Bestimmung des DNA-Gehalts nach der Methode von Burton (1956) mit Kalbsthymus DNA als Standard (Serva, Feinbiochemica, Heidelberg).

2.3. Anfertigung der histologischen Präparate und quantitative Auswertung der Autoradiogramme

Der entnommene lobus dexter lateralis wurde in 10 %-igem Formol mit 0,4 mM inaktivem Desoxythymidin fixiert, danach in Paraffin eingebettet, und schließlich wurden 3 bis 4 μm dicke Schnitte angefertigt. Es folgte die Wässerung der entparaffinierten Präparate in inaktiver Desoxythymidinlösung (0,4 mM) und die Anfertigung der Autoradiogramme (Kodak AR 10, 12-tägige Exposition bei 4°C, Entwicklungsdauer 7 Minuten bei 21°C). Abschließend wurde das Präparat mit Hämalaun-Eosin gefärbt.

Zur Auswertung der mikroskopischen Präparate wurde der ^3H -TdR-Markierungsindex bei 1000-facher Vergrößerung durch Auszählen von markierten Hepatozytenkernen gegenüber unmarkierten Kernen bestimmt. Es wurden pro Tier 5 x 1000 Kerne ausgewertet.

Im zweiten Auswertungsdurchgang wurde die Silberkornbelegung der markierten Kerne bei 1250-facher Vergrößerung (Objektiv: 100-fach, Okular 10-fach, Tubusfaktor 1,25) bestimmt. Danach wurde der Durchmesser des Hepatozytenkerns mit Hilfe eines in das Gesichtsfeld projizierten Längenmaßstabes bestimmt. Bei ellipsenförmigen Kernen wurden Längs- und Querdurchmesser, bei kreisförmigen Kernen wurde der einfache Durchmesser gemessen, so daß die Kernflächen in relativen Flächeneinheiten angegeben werden konnten. Es wurden nur solche Kerne berücksichtigt, deren Fläche nach

$$F_{\text{Ellipse}} = \frac{d_1}{2} \times \frac{d_2}{2} \times \pi$$

$$F_{\text{Kreis}} = \frac{d^2}{4} \times \pi$$

(d = Durchmesser)

mathematisch einfach erfaßbar waren. Die Errechnung der Silberkorndichte erfolgte nach der Formel:

$$\text{Silberkorndichte} = \frac{\text{Silberkornzahl}}{\text{relative Flächeneinheit}}$$

3. ERGEBNISSE

3.1. Das Verhalten der ^3H -TdR-Markierungsindices

In der Abb. 1 sind die ^3H -TdR-Markierungsindices in der regenerierenden Rattenleber 22h nach Zweidrittel-Resektion in Abhängigkeit von der Verfügbarkeitszeit mit und ohne Phenobarbitalbehandlung dargestellt. Nach 10-minütiger ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit beträgt der Markierungsindex in der Kontrollgruppe 23,4 %, erreicht nach 20 min 30,9 % und fällt nach 30 min auf 23,4 % ab. Innerhalb der Standardabweichung unterscheiden sich die beiden letzten Werte jedoch nicht signifikant vom 10-Minutenwert. Hieraus ergibt sich, daß nach etwa 10 bis 20 min Verfügbarkeitszeit des radioaktiven Prekursors annähernd ein Plateau erreicht worden ist. Dieses Verhalten wird bei der Kurve der Markierungsindices der Phenobarbital-vorbehandelten Tiere noch deutlicher. Hier beträgt der ^3H -TdR-Markierungsindex nach 10 min Verfügbarkeitszeit 15,4 %, während er sich nach 20 und 30 Minuten mit Werten von 27,8 % und 29,2 % nur noch unwesentlich ändert.

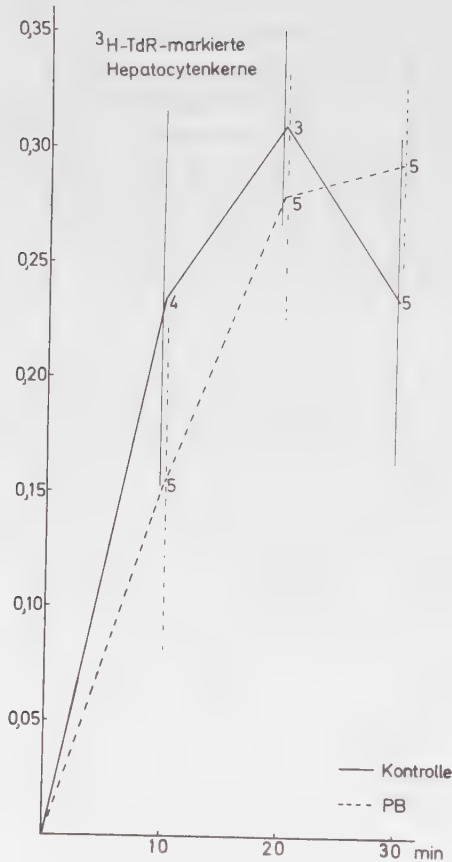


Abb. 1: ^3H -TdR-Markierungsindex 22h nach partieller Hepatektomie mit und ohne Phenobarbitalvorbehandlung der Rattenleber als Funktion der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit.
Ordinate: Fraktion ^3H -TdR-markierter Hepatozyten
Abszisse: radioaktive Verfügbarkeitszeit in Minuten
Mittelwert: $\pm$ Standardabweichung.

3.2. Veränderungen der Silberkorndichte

Der Vergleich zwischen den Kurven der Markierungsindices (Abb. 1) und den Silberkorndichten (Abb. 2) zeigt, daß sich beide Parameter in den ersten 20 Minuten der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit etwa gleichartig verhalten. Wie beim Markierungsindex, so liegt auch bei der Silberkorndichte der Wert der Phenobarbital-vorbehandelten Tiere nach 10 Minuten unterhalb des Kontrollwertes. Nach 30 min ist jedoch die Silberkorndichte in beiden Gruppen weiter angestiegen, während die Markierungsindices annähernd ein Plateau erreichen. Auch bei den Silberkorndichten überkreuzen die Werte der mit dem Pharmakon vorbehandelten Tiergruppen diejenigen der Kontrollen.

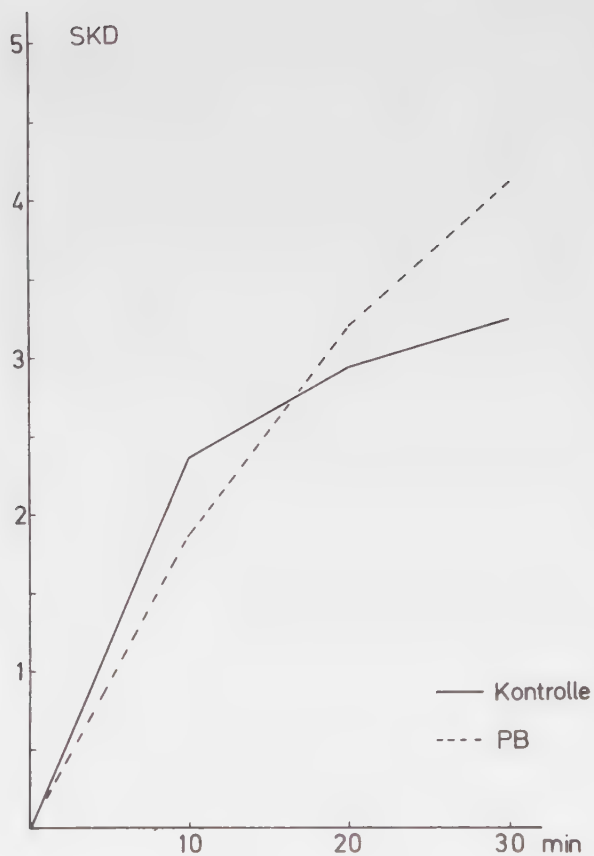


Abb. 2: Silberkorndichte 22h nach partieller Hepatektomie mit und ohne Phenobarbitalvorbehandlung der Rattenleber als Funktion der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit.

3.3. Der Anstieg der spezifischen Aktivität der DNA

Die 3. Abbildung stellt das Verhalten der spezifischen Aktivität der DNA dar. Der Vergleich, sowohl mit dem ^3H -TdR-Markierungsindex (Abb. 1) als auch mit der Silberkorndichte (Abb. 2), zeigt während sehr kurzer Verfügbarkeitszeiten eine bemerkenswerte Übereinstimmung aller drei Parameter. Während jedoch der Markierungsindex nach 20 und 30 min nicht weiter ansteigt, nehmen Silberkorndichte und spezifische Aktivität in diesem Intervall weiter zu. Im Vergleich zur Silberkorndichte steigt die spezifische Aktivität der DNA in diesem Zeitabschnitt sogar noch steiler an.

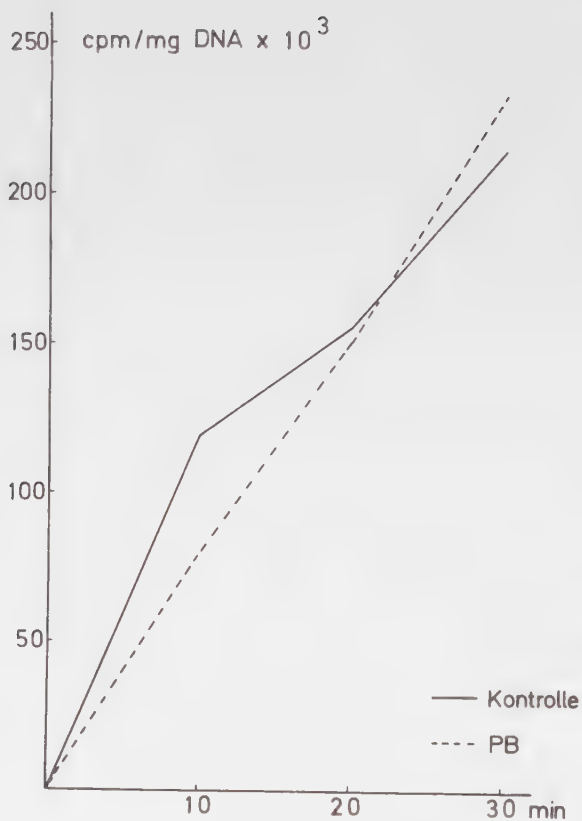


Abb. 3: Spezifische Aktivität der DNA 22h nach partieller Hepatektomie mit und ohne Phenobarbitalvorbehandlung der Rattenleber als Funktion der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit.

3.4. Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

Die Tabelle 1 gibt eine Zusammenstellung der in diesem Versuch bestimmten Parameter. In den ersten drei Spalten von links werden die bereits graphisch dargestellten Werte des Markierungsindex, der Silberkorndichte und der spez. Aktivität der DNA 22h nach partieller Hepatektomie mit und ohne Phenobarbitalbehandlung der Rattenleber in Abhängigkeit von der ^3H -Thymidin-Verfügbarkeitszeit aufgeführt. Die 4. Spalte enthält das Produkt aus SKD x LI, das sich nach den in der Einleitung angeführten theoretischen Überlegungen wie die spez. Akt. der DNA (Spalte 3) verhalten sollte, während die letzte Kolumne den Quotient aus spez. Aktivität und Markierungsindex wiedergibt, der mit der Silberkorndichte (Spalte 2) theoretisch übereinstimmt.

Tabelle 1:

<u>NaCl</u>	LI	SKD	Spez.Akt.	SKD x LI	Spez. Akt.:LI
10'	0,2340	2,3643	119039	0,5532	508713
20'	0,3087	2,9376	155000	0,90683	502105
30'	0,2328	3,2345	214326	0,75299	920644
<u>PB</u>					
10'	0,1536	1,8686	78619	0,2870	511842
20'	0,2780	3,1908	150202	0,8870	540294
30'	0,2921	4,1014	232384	1,1980	795563

3.5. Die prozentuale Änderung der Kernfläche während der ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit

Die zweite Tabelle gibt die prozentuale Änderung der Zellkernflächen während der Versuchszeit wieder; dabei wurden die 10-Minutenwerte der Kontrollgruppe gleich 100 % gesetzt. Nach 20-minütiger Verfügbarkeitszeit beträgt die angeschnittene Kernfläche im Mittel bei der Kontrollgruppe 114 % und bei der Phenobarbital-vorbehandelten Gruppe 108 %, während sie nach 30-minütiger Verfügbarkeitszeit auf 144 % bzw. 158 % angestiegen ist. In diesem Verhalten dürfte eine der Ursachen liegen, daß die Silberkorndichte (Abb. 2) im Vergleich zur spez. Akt. der DNA (Abb. 3) während dieses Zeitabschnitts weniger steil ansteigt.

Tabelle 2:

^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit	Kontrolle	PB
10 min	100 %	106 %
20 min	114 %	108 %
30 min	144 %	158 %

4. DISKUSSION

Die Aufgabe dieser Untersuchung war es, die Beziehungen zwischen Markierungsindex (LI), Silberkorndichte (SKD) und spezifischer Aktivität der DNA nach Pulsmarkierung mit ^3H -TdR am Modell der regenerierenden Rattenleber unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu analysieren. Dabei sollte insbesondere durch die simultane Bestimmung zellkinetischer Parameter mit Hilfe von biochemischen und autoradiographischen Methoden die Aussagefähigkeit der quantitativen Autoradiographie unter einfach durchzuführenden Versuchsbedingungen überprüft werden.

Die alleinige Bestimmung der spezifischen Aktivität der DNA nach ^3H -TdR-Markierung gibt zwar die Inkorporation des radioaktiven Prekursors je Zeiteinheit und mg DNA an, gestattet jedoch keine Aussage über die Größe derjenigen Zellfraktion, die während des Untersuchungszeitraumes tatsächlich an der DNA-Synthese partizipiert. Umgekehrt läßt die alleinige Bestimmung des ^3H -TdR-Markierungsindex im Autoradiogramm keine Rückschlüsse auf die DNA-Syntheseaktivität der einzelnen S-Phasenzelle zu. Auf diesen Parameter kann nur indirekt durch die mühselige Silberkornzählung, die zudem - wie eingangs diskutiert - durch zahlreiche, schwer kontrollierbare methodische Fehlermöglichkeiten eingeschränkt ist, geschlossen werden. Die mittlere DNA-Syntheseaktivität einer S-Phasenzelle und ihr reziproker Wert, die DNA-Synthesedauer (T_S), sind jedoch wesentliche zellkinetische Parameter, die z.B. erst die umfassende Beurteilung der Wirkung zytostatischer Pharmaka ermöglichen.

Diese Überlegungen, die hier am Beispiel der DNA-synthetisierenden, regenerierenden Rattenleber nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung angestellt und experimentell überprüft wurden, gelten prinzipiell auch für die Protein- oder RNA-Synthese nach ^3H -Aminosäuren- oder ^3H -Uracil-Markierung nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Geweben.

Das Problem der Bestimmung der spezifischen Aktivität liegt, wenn man einmal von methodischen Einwänden absieht, in der hierbei not-

wendigen Zerstörung der zu untersuchenden Struktur. Für das hier gewählte Beispiel bedeutet dies, daß auch keine Aussage darüber gemacht werden kann, welche Zellart in der Leber proliferiert und in welcher anatomischen Anordnung DNA-synthetisierende Zellen zu finden sind. Solche Fragestellungen lassen sich vorzugsweise mit autoradiographischen Methoden angehen; wie jedoch mehrfach erwähnt, ist der Rückschluß aus der Silberkorndichte auf die Syntheseaktivität einer bestimmten Zellstruktur - je nach Art des applizierten Vorläufers kann es sich dabei um die Protein-, RNA- oder DNA-Synthese handeln - durch methodische Schwierigkeiten eingeschränkt.

Unsere Ergebnisse führen einmal zu einem tieferen Verständnis der eben angedeuteten Problematik und zeigen zum anderen, wie sich mit autoradiographischen und biochemischen Methoden bestimmte Parameter der Zellproliferation ergänzen. Darüber hinaus geben sie Hinweise, wie unter verschiedenen experimentellen Bedingungen die einzelnen Parameter in ihrer Aussagefähigkeit zu bewerten sind.

Wie der Vergleich der Abbildungen 1 bis 3 zeigt, ergeben sich in den ersten 10 bis 20 Minuten der Verfügbarkeitszeit des markierten Vorläufers erstaunlich gute Übereinstimmungen zwischen den Kurvenverläufen des ^3H -TdR-Markierungsindex, der Silberkorndichte und der spezifischen Aktivität der DNA sowohl in der Kontrollgruppe als auch in den mit Phenobarbital vorbehandelten Tiergruppen.

Alle drei Parameter sind einander proportional, daraus folgt, daß unter diesen Bedingungen der Markierungsindex eine Funktion der Silberkorndichte ist. Wie bereits erwähnt, bezeichnet man die Zeit von der Injektion des radioaktiven Prekursors bis zum Einbau des phosphorylierten ^3H -Thymidins in die DNA als integrale Verfügbarkeitszeit; während der ersten 20 min dieses Zeitabschnittes wird der größte Anteil des exogen applizierten ^3H -TdR in die DNA inkorporiert (HUGHES et al., 1958; RUBINI et al., 1960; KISIELESKI et al., 1961; RUBINI et al., 1962; KOBURG und MAURER, 1962; LENNARTZ und MAURER, 1964). Während dieser Zeit wird das intraperitoneal injizierte ^3H -Thymidin vom Peritoneum resorbiert, ge-

langt über die Vena porta in die Leber, wird von der DNA-synthetisierenden Zelle aufgenommen, wird phosphoryliert, gelangt als Substrat der DNA-Polymerase in den Zellkern und wird während der S-Phase in die DNA eingebaut. Währenddessen ist, wie wir an dem übereinstimmenden Verhalten der drei unterschiedlichen Zellparameter sahen, die Größe des Markierungsindex abhängig von diesen Verteilungsphänomenen oder anders ausgedrückt, der Markierungsindex ebenso wie die Silberkorndichte und die spezifische Aktivität sind unter diesen Bedingungen eine Funktion der integralen Verfügbarkeitszeit. Erreicht die spezifische Aktivität einen bestimmten Schwellenwert, werden im Autoradiogramm Silberkörner erzeugt; sind genügend Silberkörner über einem Zellkern vorhanden, so wird er gegenüber dem umgebenden Background als "markiert" erkannt, und die Fraktion markierter Zellen nimmt zu. Zu Beginn der Verfügbarkeitszeit gibt der Markierungsindex also nicht den Anteil DNA-synthetisierender Zellen wieder. Die Variabilität dieser Verteilungsphänomene während kurzer Verfügbarkeitszeiten findet in der stärkeren Streubreite nach ^3H -TdR-Injektion (Abb. 1) ihren Ausdruck. Nach 20 min sind diese Verteilungsphänomene im wesentlichen beendet, der ^3H -TdR-Markierungsindex erreicht annähernd ein Plateau und gibt nun die Fraktion DNA-synthetisierender Zellen im Verhältnis zur Größe der untersuchten Gesamtzellpopulation wieder.

Die Gruppe der mit Phenobarbital vorbehandelten Tiere weist initial im Vergleich zu den Kontrollen einen etwas niedrigeren, statistisch jedoch nicht signifikant unterschiedlichen Markierungsindex auf. Das gleiche Verhalten zeigt sich sowohl bei der Silberkorndichte (Abb. 2) als auch bei der spezifischen Aktivität der DNA (Abb. 3). Wären nur die autoradiographisch bestimmbaren Parameter untersucht worden, so würde man diesen Befund wohl am wahrscheinlichsten der nach Phenobarbital beobachteten Volumenzunahme des Zytoplasmas (STÄUBLI et al., 1969; BOLENDER und WEIBEL, 1973) zuschreiben, die zu einer Änderung der Selbstabsorption der β -Strahlung geführt haben könnte. Da jedoch auch die spezifische Aktivität der Phenobarbital-behandelten Tiergruppe im Vergleich zu den Kontrollen geringer ist, dürfte dieser Effekt eher auf kurzzeitige, geringfügige Unterschiede in der Poolgröße des radioak-

tiven Prekursors zurückzuführen sein. Solche Unterschiede lassen sich beispielsweise mit einer etwas längeren Verweildauer des ^3H -Thymidins im vergrößerten Zytoplasma der Zellen nach Phenobarbitalbehandlung erklären, könnten möglicherweise aber auch durch differierende Enzymaktivitäten bewirkt werden.

Bemerkenswert scheint jedoch, daß sich die Silberkorndichte der PB-vorbehandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe nur unwesentlich ändert, obwohl - wie bereits diskutiert - Phenobarbital entscheidende Veränderungen in der Zellstruktur und in der Aktivität unterschiedlicher Enzyme induziert.

Nachdem der Markierungsindex (Abb. 1), nach Beendigung der initialen Verteilungsphänomene des exogen applizierten Thymidins, annähernd ein Plateau erreicht hat, nehmen sowohl die SKD (Abb. 2) als auch die spez. Akt. der DNA (Abb. 3) weiter zu. Dieses Verhalten ist theoretisch zu erwarten, da ja die "markierte" Zelle in ihrer DNA-Synthese, die in der regenerierenden Rattenleber 7,5 bis 8,5 h dauert, fortschreitet (LOONEY, 1960; LOONEY et al., 1967; EDWARDS und KOCH, 1964; FABRIKANT, 1967, 1968; STÖCKER, 1966; RABES et al., 1972). Bei längerer Versuchsdauer würde der Markierungsindex weiter ansteigen, da neue Zellen in das Kompartiment DNA-synthetisierender Hepatozyten eintreten; die Dissoziation zwischen Markierungsindex einerseits und Silberkorndichte und spezifischer Aktivität andererseits würde sich jedoch weiter verstärken, da mit fortschreitender S-Phasendauer mehr Chromosomen gleichzeitig an der DNA-Synthese partizipieren (LOONEY et al., 1967). Dies hat zur Folge, daß - wie an HeLa-Zellen gezeigt wurde - etwa 5 bis 6 h nach Beginn der S-Phase die mittlere DNA-Syntheserate einer Zelle um etwa den Faktor 5 angestiegen ist, ein Befund, der von Painter und Schaefer (1971) sowohl auf eine Zunahme der Replikationsorte als auch auf eine Verdopplung der DNA-Synthesegeschwindigkeit entlang eines Replikons zurückgeführt wurde.

Der Vergleich der Kurvenverläufe von SKD (Abb. 2) und spezifischer Aktivität der DNA (Abb. 3) zeigt auch nach 20- und 30-minütiger Versuchszeit eine recht gute Übereinstimmung zwischen beiden Parametern. Selbst unter den hier angewandten, einfachen Versuchsbedingungen ergibt die Silberkorndichte sowohl bei den Kon-

trolltieren als auch bei den mit Phenobarbital vorbehandelten Tieren zumindest einen qualitativen Anhalt für die Syntheseaktivität der DNA. In beiden Fällen überkreuzt die Kurve der PB-behandelten Tiere die Kontrollwerte nach etwa 20-minütiger Verfügbarkeitszeit. Die Ursache dieses Verhaltens läßt sich aus der hier durchgeführten Versuchsanordnung nicht eruieren, möglicherweise handelt es sich um eine Art Reboundeffekt, der vielleicht als Folge einer initial verzögerten ^3H -Thyminverteilung bei den PB-behandelten Gruppen auftritt. Bei weiterer Betrachtung der Kurvenverläufe fällt auf, daß der Anstieg der Silberkorndichte gegen Ende der Verfügbarkeitszeit weniger steil ist als die entsprechenden Werte der spezifischen Aktivität. Nach 30 min Verfügbarkeitszeit dissoziieren die Werte der Silberkorndichtekurven stärker als die korrespondierenden Werte der spezifischen Aktivitäten. Hierin ist der Grund zu sehen, daß unter den vorliegenden Versuchsbedingungen die experimentell ermittelten Werte den theoretisch zu erwartenden, mathematisch einfach erfaßbaren Beziehungen zwischen den verschiedenen Parametern untereinander, wie sie in einem der vorangehenden Kapitel aufgestellt wurden, nicht genügen. In der tabellarischen Zusammenstellung der in diesem Versuch bestimmten Parameter (Tabelle 1) wird dieses insbesondere bei der näheren Betrachtung einzelner Beispiele deutlich.

Die Untersuchung einzelner Beispiele zeigt, daß die experimentell bestimmten Werte den theoretisch denkbaren Idealbedingungen nur unzureichend genügen. Wird das Produkt aus $\text{SKD} \times \text{LI}$ (Spalte 4) betrachtet, so ergibt sich wiederum in den ersten 20 min der radioaktiven Verfügbarkeitszeit eine gute Übereinstimmung mit dem Verhalten der spez. Aktivität der DNA (Abb. 3). Während das Produkt $\text{SKD} \times \text{LI}$ bei den Phenobarbital-behandelten Tieren auch nach 30 min weiter ansteigt und somit insgesamt eher gut mit dem nahezu linearen Anstieg der spezifischen Aktivität (Abb. 3) übereinstimmt, fällt das Produkt $\text{SKD} \times \text{LI}$ bei der NaCl-behandelten Kontrollgruppe (Spalte 4 der Tabelle) auf 0,7299 ab. Nach 30 min ^3H -TdR-Verfügbarkeitszeit dissoziieren die Werte zwischen tatsächlich gemessener spez. Akt. der DNA und dem theoretisch zu erwartenden gleichartigen Verhalten des Produktes $\text{SKD} \times \text{LI}$. Ein wesentlicher Grund für diese Unterschiede dürfte der Abfall des

Markierungsindex zu diesem Zeitpunkt sein, der in der Abbildung 1 deutlich zutage tritt.

Auch die Betrachtung eines zweiten Beispiels zeigt, daß der Quotient aus spez. Akt. der DNA und Markierungsindex der theoretisch mit dem Verhalten der SKD übereinstimmen sollte, diese Forderung nicht immer erfüllt. Während sich sowohl bei den Phenobarbitalvorbehandelten Tieren als auch bei der Kontrollgruppe (Spalte 5) diese Quotienten im Intervall zwischen 10 und 20 min nur unwesentlich ändern, steigt die Silberkorndichte (Abb. 2) in diesem Zeitabschnitt weiter an.

Wie bereits hervorgehoben, steigt die Silberkorndichte gegen Ende der Versuchszeit weniger an als die entsprechenden Werte der spezifischen Aktivität der DNA (vgl. Abb. 2 und 3). Diese Beobachtung kann im wesentlichen mit der zunehmenden Fläche der angeschnittenen Kerne erklärt werden (Tab. 2). Aus früheren Arbeiten von Grundmann und Hofmeier (1962) ist bekannt, daß in der regenerierenden Rattenleber 30 h nach Zweidrittelhepatektomie eine Verdopplung des Kernvolumens zu finden ist. Wie interferometrische Messungen zeigten, ist diese Volumenzunahme zu 5/6 durch Wassereinklagerung und nur zu 1/6 durch Vermehrung der Trockenmasse bedingt. Wie in dem Kapitel über die "Quantitative Autoradiographie" diskutiert, ist hierdurch eine stärkere Änderung der β -Selbstabsorption zu erwarten. Der Befund, daß nach 30-minütiger radioaktiver Versuchszeit die Kernfläche in der Kontrollgruppe auf 144 % und in der Phenobarbital-behandelten Gruppe auf 158 % im Vergleich zum 10-Minutenwert der Kontrolle (100 %) anstieg, erscheint bemerkenswert und soll im folgenden kurz diskutiert werden.

Möglicherweise spielen hier Artefakte bei der Fixation oder radio-toxische Effekte, die über den Mechanismus einer Permeabilitätsänderung zum Wassereinstrom führen könnten, eine entscheidende Rolle. Bei längerer in-vitro-Inkorporation haben bereits geringe ^3H -TdR-Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf HeLa-Zellkulturen (PAINTER et al., 1958; PAINTER und ROBERTSON, 1959) oder führen in vivo unter bestimmten Bedingungen zur Verschiebung zu höheren Ploidiestufen (POST und HOFFMAN, 1961) oder zur Verlängerung der G_1 -Phase (POST und HOFFMAN, 1967) in der regenerierenden Ratten-

leber. Über Kernschwellungen nach kurzen radioaktiven Versuchszeiten ist jedoch unseres Wissens nichts bekannt. Die oben beschriebene Beobachtung sollte daher näher untersucht werden, da sie bei alleiniger Anwendung autoradiographischer Verfahren leicht zu Fehlinterpretationen führen kann.

Die in dieser Arbeit diskutierten Fragen haben gezeigt, daß sich mit autoradiographischen und biochemischen Methoden bestimmte Parameter der Zellproliferation sinnvoll ergänzen können und daß aus den gleichzeitig bestimmten Werten der spez. Aktivität der DNA und des ^3H -Markierungsindex auf die Inkorporationsaktivität einer einzelnen S-Phasenzelle geschlossen werden kann. Da auch die Silberkorndichte über dem Zellkern nach ^3H -TdR-Pulsmarkierung ein Maß für die ^3H -TdR-Inkorporationsaktivität einer einzelnen Zelle ergibt, läßt sich durch Anwendung der beiden unterschiedlichen Methoden die Aussagefähigkeit der quantitativen Autoradiographie überprüfen. Dabei zeigte sich in dem hier durchgeführten Experiment, daß die Silberkorndichte, selbst unter einfachen Versuchsbedingungen, qualitativ mit der spez. Aktivität der DNA übereinstimmt; diese Übereinstimmung korreliert jedoch nicht so streng, daß sich mathematische Beziehungen aufstellen lassen. Im folgenden sollen noch kurz einige Probleme der quantitativen Autoradiographie besprochen werden, bei deren Beachtung eine weitere Verbesserung der Übereinstimmung zwischen biochemisch und autoradiographisch gewonnenen Ergebnissen erwartet werden kann. Einmal sollte bei der Planung eines Experimentes darauf geachtet werden, daß die Silberkorndichte zwischen minimalen und maximalen Werten nicht zu stark differiert. In der hier durchgeführten Versuchsanordnung lag die SKD gegen Ende der Versuchszeit bereits nahe an der Grenze der Auswertbarkeit. Ein weiteres Problem, insbesondere der quantitativen Autoradiographie, ist der Background, auf dessen Korrektur hier verzichtet wurde. Da innerhalb einer Versuchsreihe Schwankungen des Backgrounds von Präparat zu Präparat auftreten können (SAWICKI et al., 1971), fällt es zunächst schwer, Kriterien, anhand derer der Nullwert berücksichtigt werden kann, zu finden. Sawicki und Mitarbeiter (1971) zeigten, daß die Höhe des Backgrounds selbst innerhalb eines Präparates schwankt. In der hier durchgeführten Versuchsanordnung hatten wir den Background über Kernen be-

stimmt, die nicht als "markiert" anzusehen waren, und gefunden, daß die so bestimmten Werte zu verschiedenen Versuchszeiten den gleichen prozentualen Anteil der gemessenen Silberkorndichte betrug, so daß auf eine Korrektur verzichtet werden konnte, da hier der Meßfehler immer gleich groß war. Auf weitere Fehlermöglichkeiten der quantitativen Autoradiographie wurde in einem eigenen Kapitel hingewiesen. Bei unseren Experimenten war gegen Ende der radioaktiven Verfügbarkeitszeit die Silberkornbelegung der markierten Kerne so hoch, daß eine exakte Bestimmung der Silberkorndichte erschwert wurde. Es ist sicher möglich, daß bei weiterer Standardisierung der Versuchsanordnung die Ergebnisse der Silberkorndichtebestimmung weiter verbessert werden können; insbesondere dann, wenn die Dichte der untersuchten Zellstruktur - z.B. durch gleichzeitige interferometrische Messungen - und damit die Größe der β -Selbstabsorption bekannt ist. Andererseits zeigen diese Experimente, daß die Silberkorndichte, auch bei einfachen Versuchsbedingungen, durchaus ein qualitatives Bild der inkorporierten ^3H -TdR-Aktivität vermittelt. Da jedoch die Kenntnis der spezifischen Aktivität der DNA in Verbindung mit dem ^3H -TdR-Markierungsindex mit relativ einfachen Mitteln ebenfalls den Rückschluß auf die ^3H -TdR-Inkorporation einer einzelnen S-Phasenzelle ermöglicht, erscheint nur für ganz bestimmte Fragestellungen die mühevoll durchgeführte quantitative Autoradiographie unter besser standardisierten Versuchsbedingungen notwendig, um innerhalb einer nur partiell synchronisierbaren Population proliferierender Zellen auf das biologische Verhalten einer einzelnen Zelle schließen zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Autoradiographie ist in den letzten zwanzig Jahren zu einer häufig angewandten Untersuchungsmethode in der biologischen Forschung geworden und hat zum Verständnis der Zellproliferation entscheidend beigetragen. Während in den Anfängen der autoradiographischen Technik qualitative Untersuchungsmethoden im Vordergrund standen, versuchte man mit zunehmendem Erkenntnisstand, die Autoradiogramme quantitativ auszuwerten. Die Methode der quantitativen Autoradiographie und ihre Fehlermöglichkeiten werden im ersten Teil dieser Arbeit diskutiert. Es zeigt sich, daß sich aus theoretischen und praktischen Erwägungen heraus dann Schwierigkeiten ergeben, wenn die Frage nach der Anzahl der im Autoradiogramm entstandenen Silberkörner gestellt wird, und zwar mit der Absicht, aus dieser Angabe Rückschlüsse auf die Menge der je Zeiteinheit inkorporierten radioaktiven Vorläufer zu schließen.

Die simultane Bestimmung der Silberkorndichte im Autoradiogramm einerseits und der spezifischen Aktivität der DNA-Synthese nach Applikation von ^3H -Thyminid andererseits ermöglicht es jedoch, theoretische Beziehungen zwischen diesen Parametern herzustellen und unter relativ einfachen Versuchsbedingungen die Aussagekraft der quantitativen Autoradiographie zu überprüfen.

Die Fragestellung dieser Arbeit war es daher, die Beziehungen zwischen Markierungsindex und Silberkorndichte im Autoradiogramm sowie der biochemisch bestimmten spezifischen Aktivität der DNA nach ^3H -Thyminid-Applikation am Modell der regenerierenden Rattenleber unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu überprüfen.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß während kurzer radioaktiver Verfügbarkeitszeiten Markierungsindex, Silberkorndichte und spezifische Aktivität der DNA eine Funktion der Verfügbarkeitszeit sind. Unter diesen Bedingungen gibt der ^3H -Thyminid-Markierungsindex nicht die Anzahl DNA-synthetisierender Zellen wieder, sondern hängt lediglich von dem ^3H -Thyminidverteilungsphänomen ab. Mit zunehmender Silberkorndichte wird der Zellkern gegenüber der Umgebung als markiert erkannt. Nach 10- bis 20-minütiger ^3H -Thyminidverfügbar-

keitszeit gibt die Anzahl der markierten Kerne den tatsächlichen Anteil DNA-synthetisierender Zellen wieder. Von diesem Zeitpunkt an bleibt, unter den vorgewählten Versuchsbedingungen, der Markierungsindex relativ konstant, während Silberkorndichte und spezifische Aktivität der DNA mit fortschreitender DNA-Synthese einer S-Phasenzelle zunehmen. Es verhalten sich spezifische Aktivität und Silberkorndichte unter verschiedenen Versuchsbedingungen - beispielsweise der Vorbehandlung der regenerierenden Rattenleber mit Phenobarbital - etwa gleichsinnig. Die Bestimmung der Silberkornzahl wird jedoch mit fortschreitender Versuchsdauer durch die zu hohe Korndichte eingeschränkt. Als eine mögliche Fehlerquelle der Silberkornbestimmung wurden die Effekte der Radiontoxizität auf das Kernvolumen beschrieben.

Die simultane Anwendung autoradiographischer und biochemischer Methoden ermöglicht es, die spezifische Aktivität der DNA auf diejenigen Zellen, die sich tatsächlich in der DNA-Synthesephase befinden, zu beziehen, und somit in vielen Fällen auf die mühselige Bestimmung der Silberkornzahl zu verzichten.

In der vorliegenden Arbeit wurden die theoretischen Beziehungen zwischen den unterschiedlichen Parametern der Zellproliferation diskutiert. Die Kombination verschiedener Untersuchungsmethoden scheint durchaus ein geeigneter Weg, das Verhalten proliferierender Zellsysteme besser zu verstehen.

LITERATURVERZEICHNIS

ALBOUY, G., et H. FARAGGI:

Sur le mécanisme du fading des plaques pour recherches nucléaires. C.R. Acad. Sci. 228, 68-70 (1949)

AMLACHER, E.:

Autoradiographie in Histologie und Cytologie.
Thieme, Leipzig, Gustav Fischer, Stuttgart (1974)

BACHMANN, L. and M. M. SALPETER:

Autoradiography with the electron microscope. A quantitative evaluation.
Lab. Invest. 14, 303/1041-315/1053 (1965)

BACHMANN, L. and M. M. SALPETER:

Absolute sensitivity of electron microscope radioautography. J. Cell Biol. 33, 299-305 (1967)

BARON, J. and T.R. TEPHLY:

Further studies on the relationship of the stimulatory effect of phenobarbital and 3,4-benzpyrene on hepatic heme synthesis to their efforts on hepatic microsomal drug oxidations.
Arch.Biochem.Biophys. 139, 410-420 (1970)

BOLENDER, R. P. and E. R. WEIBEL:

A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of treatment.
J.Cell Biol. 56, 746-764 (1973)

BUCHER, N. L. R. and N. J. OAKMAN:

Thymidine triphosphate content of regenerating rat liver.
Biochim.Biophys.Acta 186, 13-20 (1969)

BUDILLON, G., M. CARRELLA and M. COLTORTI:

Phenobarbital liver microsomal induction in MHV-3 viral hepatitis of the mouse.

Experientia 28, 1011-1012 (1972)

BÜRKI, K., R. SCHINDLER and M. PFENNINGER:

Studies on liver regeneration. II. Effects of phenobarbital on the onset and pattern of rat liver regeneration following partial hepatectomy.

Cell Tiss.Kinet. 4, 529-537 (1971)

BURTON, K.:

A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 62, 315-323 (1956).

CARO, L. G. and M. SCHNÖS:

Tritium and phosphorus-32 in high-resolution autoradiography.

Science 149, 60-62 (1965)

CHANG, L. O. and W. B. LOONEY:

A biochemical and autoradiographic study of the in vivo utilization of tritiated thymidine in regenerating rat liver.

Cancer Res. 25, 1817-1822 (1965)

CHEDID, A. and V. NAIR:

Diurnal rhythm in endoplasmic reticulum of rat liver: electron microscopic study.

Science 175, 176-179 (1972)

CROFT, D. N. and M. LUBRAN:

The estimation of deoxyribonucleic acid in the presence of sialic acid: application to analysis of human gastric washings.

Biochem.J. 95, 612-620 (1965)

CZOK, G. and H. G. DANMANN:

Effect of phenobarbital on the volume of the biliary tree in the rat.

Experientia 28, 1463-1464 (1972)

DISCHE, Z.:

Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonucleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen.

Mikrochemie 8, 4-32 (1930)

DÖRMER, P.:

Auflichtphotometrische Untersuchungen zur Größe der Koinzidenz in der Autoradiographie mit Tritium.

Histochemie 8, 1-8 (1967)

DÖRMER, P., W. BRINKMANN, A. STIEBER und W. STICH:

Automatische Silberkornzählungen in der Einzelzell-Autoradiographie.

Klin.Wschr. 44, 477-482 (1966)

DUDLEY, R. A. and S. R. PELC:

Automatic grain counter for assessing quantitatively high-resolution autoradiographs.

Nature 172, 992 (1953)

EDWARDS, J.L. and A. KOCH:

Parenchymal and littoral cell proliferation during liver regeneration.

Lab.Invest. 13, 32-43 (1964)

FABRIKANT, J. I.:

Cell proliferation in the regenerating liver and the effect of prior continuous irradiation.

Radiation Res. 32, 804-826 (1967d)

FABRIKANT, J. I.:

The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver.

J. Cell Biol. 36, 551-565 (1968)

FOUTS, J. R. and L. A. ROGERS:

Morphological changes in the liver accompanying stimulation of microsomal drug metabolizing enzyme activity of phenobarbital, chlordane, benzpyrene or methylcholanthrene in rats.

J.Pharmacol.exp.Ther. 147, 112-119 (1965)

GREIM, H., J. B. SCHENKMANN, M. KLOTZBÜCHER and H. REMMER:

The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b_5 and cytochrome P_{450} hemes in the rat.

Biochim.biophys.Acta (Amst.) 201, 20-25 (1970)

GRUNDMANN, E. und G. HOFMEIER:

Kern-Trockenmassen und Kern-Volumina in der regenerierenden Rattenleber.

Naturwiss. 49, 235-236 (1962)

HARDONK, M. J. and J. KOUDSTAAL:

Enzyme histochemical investigations in rat liver after phenobarbital and methylcholanthrene treatment.

Acta histochemica (Jena) Suppl. 12, 273-278 (1972)

HERDSON, P. B., P. J. GARVIN and R. B. JENNINGS:

Fine structural changes in rat liver induced by phenobarbital.

Lab.Invest. 13, 1032-1037 (1964)

HERZ, R. H.:

Methods to improve the performance of stripping emulsions.

Lab.Invest. 8, 71-81 (1959)

HIGGINS, G. M. and R. M. ANDERSON:

Experimental pathology of the liver of the white rat following partial surgical removal.

Arch.Path. 12, 186-202 (1931)

HUGHES, W. L., V. P. BOND, G. BRECHER, E. P. CRONKITE,

R. B. PAINTER, H. QUASTLER and F. G. SHERMAN:

Cellular proliferation in the mouse as revealed by autoradiography with tritiated thymidine.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 44, 476-483 (1958)

JAPUNDŽIĆ, M., B. KNEŽEVIĆ, V. DJORDJEVIĆ-CAMBA and I. JAPUNDŽIĆ:

The influence of phenobarbital-Na on the mitotic activity of parenchymal liver cells during rat liver regeneration.

Exp.Cell Res. 48, 163-167 (1967)

JONES, A. L. and D. T. ARMSTRONG:

Increased cholesterol biosynthesis following phenobarbital induced hypertrophy of agranular endoplasmic reticulum in liver.

Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 119, 1136-1139 (1965)

JONES, A. L. and D. W. FAWCETT:

Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital with a view on the function of this organelle in the liver.

J.Histochem.Cytochem. 14, 215-232 (1966)

KATO, R., W. R. JONDORF, L. A. LOEB, T. BEN and H. V. GELBOIN:

Studies on the mechanisms of drug-induced microsomal enzyme activities. V. Phenobarbital stimulation of endogenous mRNA and polyuridylic acid-directed L-(¹⁴C)-phenylalanine incorporation.

Molec.Pharmacol. 2, 171-186 (1966)

- KEIDING, S., P. B. ANDREASEN and L. FAUERHOLDT:
Effect of phenobarbital induction on galactose elimination capacity in the rat.
Biochem.Pharmacol. 22, 2293-2297 (1973)
- KISIELESKI, W. E., R. BASERGA and H. LISCO:
Tritiated thymidine and the study of tumors.
Atompraxis 7, 81-85 (1961)
- KLASSEN; C. D.:
Biliary flow after microsomal enzyme induction.
J.pharmac.exp.Ther. 168, 218-223 (1969)
- KOBURG, E. and W. MAURER:
Autoradiographische Untersuchung mit (H-3) Thymidin über die Dauer der Desoxyribonukleinsäure-Synthese und ihren zeitlichen Verlauf bei den Darmepithelien und anderen Zelltypen der Maus.
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 61, 229-242 (1962)
- KOPRIWA, B. M. and C. P. LEBLOND:
Improvements in the coating technique of radioautography.
J.Histochem.Cytochem. 10, 269-284 (1962)
- KURIYAMA, Y., T. OMURA, P. SIEKEVITZ and G. E. PALADE:
Effects of phenobarbital on the synthesis and degradation of the protein components of rat liver microsomal membranes.
J.Biol.Chem. 244, 2017-2026 (1969)
- LAJTHA, L. G. and R. OLIVER:
The application of autoradiography in the study of nucleic acid metabolism.
Lab.Invest. 8, 214-224 (1959)

LANG, W., D. MÜLLER und W. MAURER:

Prozentuale Beteiligung von exogenem Thymidin an der Synthese von DNS-Thymidin in Geweben der Maus und in HeLa-Zellen.

Exp.Cell Res. 49, 558-571 (1968)

LENNARTZ, K.-J. und W. MAURER:

Autoradiographische Bestimmung der Dauer der DNS-Verdopplung und der Generationszeit beim Ehrlich-Ascites-Tumor der Maus durch Doppelmarkierung mit C-14- und H-3-Thymidin.

Z.Zellforsch. 63, 478-495 (1964)

LOONEY, W. B.:

The replication of deoxyribonucleic acid in hepatocytes.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 46, 690-698 (1960)

LOONEY, W. B., L. O. CHANG and F. W. BANGHART:

The rate of DNA replication at the molecular, chromosomal, cellular, and intracellular levels in regenerating rat liver.

Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 57, 972-978 (1967)

LU, A. Y. H., W. LEVIN, S. B. WEST, M. JACOBSON, D. RYAN,
R. KUNTZMAN and A. H. CONNEY:

Reconstituted liver microsomal enzyme system that hydroxylates drugs, other foreign compounds, and endogenous substrates. VI. Different substrate specificities of the cytochrome P₄₅₀ fractions from control and phenobarbital treated rats.

J.Biol.Chem. 248, 456-460 (1973)

MAURER, W. und E. PRIMBSCH:

Größe der β -Selbstabsorption bei der ³H-Autoradiographie.

Exp.Cell Res. 33, 8-18 (1964)

MAZIA, D., W. S. PLAUT and G. W. ELLIS:

A method for the quantitative assessment of autoradiographs. Exp.Cell Res. 9, 305-312 (1955)

McLAUGHLIN, W. L. and M. EHRLICH:

Film badge dosimetry: how much fading occurs?
Nucleonics 12, No 10, 34-36 (1954)

MENDELSON, M. L.:

The growth fraction: A new concept applied to tumors.
Science 132, 1496 (1960a)

MESSIER, B. and C. P. LEBLOND:

Preparation of coated radioautographs by dipping sections
in fluid emulsion.
Proc.Soc.exp.Biol. (N. Y.) 96, 7-10 (1957)

MUNRO, H. N. and A. FLECK:

The determination of nucleic acids. In:Methods of bio-
chemical analysis (ed. by D. Glick), vol. XIV, p.113-
176. New York-London-Sidney: Interscience Publishers,
a division of John Wiley & Sons 1966.

NORRIS, W. P. and L. A. WOODRUFF:

The fundamentals of radioautography.
Ann.Rev.nuclear Sci. 5, 297-325 (1954)

ORRENIUS, S. and J. L. E. ERICSSON:

Enzyme-membrane relationship in phenobarbital induction
of synthesis of drugmetabolizing enzyme system and pro-
liferation of endoplasmic membranes.
J.Cell Biol. 28, 181-198 (1966)

ORRENIUS, S., J. L. E. ERICSSON and L. ERNSTER:

Phenobarbital-induced synthesis of the microsomal drug-
metabolizing enzyme system and its relationship to the
proliferation of endoplasmic membranes.
J.Cell Biol. 25, 627-639 (1965)

PAINTER, R. B. and J. S. ROBERTSON:

Effect of irradiation and theory of role of mitotic
delay on the time course of labeling of HeLa S3 cells
with tritiated thymidine. Radiat.Res. 11, 206-217 (1959)

PAINTER, R. B. and A. W. SCHAEFER:

Variation in the rate of DNA chain growth through the S-phase in HeLa cells.

J.molec.Biol. 58, 289-295 (1971)

PAINTER, R. B., R. M. DREW and W. L. HUGHES:

Inhibition of HeLa growth by intranuclear tritium.

Science 127, 1244-1245 (1958)

PAULINI, K. und G. BENEKE:

Untersuchungen zur Lebervergrößerung durch Phenobarbital.

Verh.dtsch.Ges.Path. 54, 518-524 (1970)

PAULINI, K., G. BENEKE und R. KULKA:

Lebervergrößerung durch Phenobarbital in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Beitr.path.Anat. 141, 327-348 (1970)

PAULINI, K., G. BENEKE und R. KULKA:

Der Mechanismus der Lebervergrößerung nach verschieden hoher Phenobarbitaldosis.

Beitr.path.Anat. 143, 283-294 (1971a)

PAULINI, K., G. BENEKE und R. KULKA:

Zytophotometrische und autoradiographische Untersuchungen zur Lebervergrößerung nach Phenobarbital in Abhängigkeit vom Lebensalter.

Beitr.path.Anat. 144, 319-326 (1971b)

PAULINI, K., G. BENEKE und R. KULKA:

Der Mechanismus der Lebervergrößerung seniler Ratten nach Applikation von Phenobarbital.

Akt.Geron. 2, 521-525 (1972a)

PAULINI, K., H. SCHRIEFERS, H. OCKENFELS und G. BENEKE:

Proteinbestand und Aktivität mikrosomaler Enzyme der Leber von Ratten verschiedener Altersstufen unter der

Behandlung mit Phenobarbital.
Beitr.path.Anat. 147, 366-378 (1972b)

POST, J. and J. HOFFMAN:
Some effects of tritiated thymidine as a deoxyribonucleic
acid label in the rat liver.
Radiat.Res. 14, 713-720 (1961)

POST, J. and J. HOFFMAN:
Late effect of H-3-TdR as a DNA label on liver cell
replication.
Radiat.Res. 30, 748-758 (1967)

QUASTLER, H. and F. G. SHERMAN:
Cell population kinetics in the intestinal epithelium
of the mouse.
Exp.Cell Res. 17, 420-438 (1959)

RABES, H. M., R. WIRSCHING und H.-V. TUCZEK:
Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie.
Naturwiss. 59, 221-222 (1972)

REMMER, H. and H.-J. MERKER:
Enzyminduktion und Vermehrung von endoplasmatischem
Reticulum in der Leberzelle während der Behandlung mit
Phenobarbital (Luminal).
Klin.Wschr. 41, 276-283 (1963a)

REMMER, H. and H.-J. MERKER:
Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum
associated with drug-metabolizing enzymes.
Science 142, 1657-1658 (1963b)

RUBINI, J. R., E. P. CRONKITE, V. P. BOND and T. M. FLIEDNER:
The metabolism and fate of tritiated thymidine in man.
J.clin.Invest. 39, 909-918 (1960)

RUBINI, J. R., S. KELLER, A. EISENTRAUT and E. P. CRONKITE:

In vitro metabolism of 3-H-thymidine. In: Tritium in the physical and biological sciences, vol. II, p.247-267, I.A.E.A., Vienna (1962)

RÜTTIMANN, G.:

Effect of phenobarbital on hepatocyte proliferation in rats following partial hepatectomy.

Experientia (Basel) 28, 1196-1197 (1972)

SAWICKI, W., O. BLATON, J. ROWIŃSKI:

Correction of autoradiographic grain count in respect to precisely calculated background.

Histochemie 26, 67-73 (1971)

SCHINDLER, R. and K. BÜRKI:

Effects of phenobarbital on rat liver regeneration.

Experientia 27, 730 (1971)

SCHLICHT, I., W. KORANSKY, S. MAGOUR and R. SCHULTE-HERMANN:

Größe und DNS-Synthese der Leber unter dem Einfluß körperfremder Stoffe.

Naunyn-Schmiedebergs Arch.Pharmak.exp.Path. 261, 26-41 (1968)

SCHLICHT, I., W. KORANSKY, R. SCHULTE-HERMANN und S. MAGOUR:

Zur Lebervergrößerung unter dem Einfluß von Pharmaka.

Verh.dtsch.Ges.inn.Med. 73, 251-255 (1967)

SCHMIDT, G. and G. J. THANNHAUSER:

A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteine in animal tissues.

J.biol.Chem. 161, 83-89 (1945)

SCHULTE-HERMANN, R., I. SCHLICHT, W. KORANSKY, C. LEBERL,

C. EULENSTEDT and M. ZIMEK:

Selective inhibition of liver cell proliferation by CFT 1201 and SKF 525A. Studies on growth processes

induced by drugs and by partial hepatectomy.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmacol. 273, 109-122
(1972)

SCHULTE-HERMANN, R., R. THOM, I. SCHLICHT und W. KORANSKY:
Zahl und Ploidiegrad der Zellkerne der Leber unter dem
Einfluß körperfremder Stoffe. Analysen mit Hilfe eines
elektronischen Partikelzählgerätes.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch.Pharmak.exp.Path. 261, 42-58
(1968)

SCHULTZE, B.:
Die Orthologie und Pathologie des Nukleinsäure- und
Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm. In:
Handbuch der allg. Pathologie II/5, 466-670.
Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1968)

SCHUSTER, L. and H. JICK:
The turnover of microsomal protein in the livers of
phenobarbital-treated mice.
J. biol.Chem. 241, 5361-5365 (1966)

STÄUBLI, W., R. HESS and E. R. WEIBEL:
Correlated morphometric and biochemical studies on the
liver cell. II. Effects of phenobarbital on rat hepato-
cytes.
J.Cell Biol. 42, 92-112 (1969)

STENGER, R. J., R. A. MILLER and J. W. WILLIAMSON:
Effects of phenobarbital pretreatment of carbon
tetrachloride.
Exp.Mol.Pathol. 13, 242-252 (1970)

STENGER, R. J. and E. A. JOHNSON:
Modifying effect of 3-amino-1,2,4-triazole on pheno-
barbital-induced changes in rat liver.
Exp.molec.Path. 16, 147-157 (1972)

STÖCKER, E.:

Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh.dtsch.Ges.Path. 50, 53-74 (1966)

TOLLES, W. E.:

Methods of automatic quantitation of microautoradio-
graphs.
Lab.Invest. 8, 99-112 (1959)

TÓTH, S., T. SZILÁGGI and J. CZONGOR:

Effect of spironolactone and phenobarbital on the
plasma fibrinogen in rats.
Experientia 28, 1289-1290 (1972)

TUCZEK, H.-V., W. SKORUPPA und H. M. RABES:

Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen
Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der rege-
nerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobar-
bital.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 17, 347-361 (1975)

WIMBER, D. E., H. QUASTLER, O. L. STEIN and D. R. WIMBER:

Analysis of tritium incorporation into individual cells
by autoradiography of squash preparations.
J.biophys.biochem.Cytol. 8, 327-331 (1960)

LEBENS LAUF

Als Sohn des Verlagskaufmanns Wolfgang Horst Stolpe und seiner Ehefrau Wesska Stolpe, geborene Matschewa, wurde ich am 25. Juli 1945 in Rosenheim, Oberbayern, geboren.

Von 1952 bis 1960 besuchte ich die Freie Waldorfschule in Engelberg, Württemberg; danach für ein Jahr die Rudolf-Steiner-Schule Elmfield-School in Stourbridge, England; und schließlich ab 1961 die Freie Waldorfschule in Stuttgart. Hier legte ich am 11.3.1965 die Reifeprüfung ab. Im Sommersemester 1966 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München das Studium der Medizin und legte hier am 10.4.1968 die naturwissenschaftliche Vorprüfung und am 23.9.1969 die ärztliche Vorprüfung ab. Die klinischen Semester studierte ich ebenfalls an der Ludwig-Maximilians-Universität und legte am 20.12.1972 die ärztliche Prüfung ab. Meine Medizinalassistentenzeit leistete ich an der chirurgischen und an der 2. Medizinischen Abteilung des Krankenhauses München-Harlaching sowie an der neurochirurgischen Abteilung des Klinikums Steglitz an der Freien Universität Berlin. Seit Juli 1974 befinde ich mich in der chirurgischen Facharztausbildung im Krankenhaus München-Harlaching.

